

PEMBENTUKAN KALUS REMAH DARI EKSPLAN DAUN RAMIN
(*Gonystylus bancanus* (Miq) Kurz.)
[*Friable callus induction from leaf explant of ramin (Gonystylus bancanus (Miq) Kurz.)*]

Yelnititis

Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan
e-mail : yelnititis@yahoo.com

ABSTRACT

Ramin (Gonystylus bancanus (Miq.) Kurz) is the most favourite and the most over exploited woody species. This species has been listed in CITES APPENDIX II from 2004. The purpose of this experiment is to obtain the best treatment for friable and embryogenic callus formation that can develop to somatic embryo. Basal Murashige and Skoog (MS) media was used as growth medium. The experiment was conducted in three stages : callus induction and propagation stage, friable callus induction stage and embryogenic callus induction stage. The treatment of 3.0 – 5.0 mg/l 2,4-D was used for callus induction. The best of callus was propagated in 5.0 mg/l 2,4-D + 1.0 – 2.0 mg/l thidiazuron. The best of callus was subcultured for callus friable induction used 6.0 mg/l 2,4-D + 1.0 – 2.0 mg/l thidiazuron + 1.0 – 2.0 mg/l biotin. The best friable callus was subcultured for embryogenic callus induction used 7.0 – 8.0 mg/l 2,4-D + 1.0 – 2.0 mg/l biotin. The observation was made on texture, percentages, performance and color of friable callus. The results showed that callus can be induced on 5.0 mg/l 2,4-D. The treatment of 6.0 mg/l 2,4-D + thidiazuron produced friable callus yellowish on color. 2,4-D + biotin treatment produced very friable callus with yellowish on color and with no embryogenic callus development.

Keywords : Ramin, leaf, 2,4-D, thidiazuron, biotin, callus and friable callus.

ABSTRAK

Ramin (*Gonystylus bancanus* (Miq.) Kurz) merupakan salah satu spesies penghasil kayu yang banyak diminati untuk diperdagangkan dan paling banyak dieksploitasi. Sejak tahun 2004 jenis ini sudah dimasukkan ke dalam APPENDIX II CITES. Penelitian bertujuan untuk mendapatkan metoda terbaik untuk pembentukan kalus remah dan embriogenik yang dapat berkembang membentuk embrio somatik. Media MS dijadikan sebagai media dasar. Penelitian dilakukan dalam tiga tahap yaitu tahap induksi dan perbanyakan kalus, tahap induksi kalus remah dan tahap induksi kalus embriogenik. Perlakuan yang diuji untuk induksi kalus adalah 3,0 – 5,0 mg/l 2,4-D. Kalus terbaik diperbanyak pada perlakuan 5,0 mg/l 2,4-D + 1,0 – 2,0 mg/l thidiazuron. Kalus terbaik hasil perbanyakan dikulturkan pada perlakuan 6,0 mg/l 2,4-D + 1,0 – 2,0 mg/l thidiazuron + 1,0 – 2,0 mg/l biotin untuk induksi kalus remah. Kalus remah terbaik disubkultur pada perlakuan 7,0 – 8,0 mg/l 2,4-D + 1,0 – 2,0 mg/l biotin untuk induksi kalus embriogenik. Pengamatan dilakukan terhadap tekstur, persentase, penampilan dan warna kalus remah secara visual. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kalus dapat diinduksi dari perlakuan 5,0 mg/l 2,4-D. Dari perlakuan 6,0 mg/l 2,4-D + thidiazuron dihasilkan kalus remah dan berwarna kekuningan. Dari perlakuan 2,4-D + biotin dihasilkan kalus dengan struktur sangat remah, berwarna kekuningan. Dari tahapan perlakuan yang sudah dilakukan belum dihasilkan kalus embriogenik.

Keywords : Ramin, daun, 2,4-D, thidiazuron, biotin, kalus and kalus remah

I. PENDAHULUAN

Ramin (*Gonystylus bancanus* (Miq.) Kurz) termasuk kedalam famili Thymelaceae yang tumbuh di hutan rawa gambut (Soerianegara dan Lemmens, 1994) dan merupakan pohon penghasil kayu yang berpotensi untuk dikembangkan. Terdapat lebih dari 20 jenis yang termasuk ke dalam genus *Gonystylus*. *Gonystylus bancanus* (Miq) Kurz.) merupakan jenis yang paling banyak dieksploitasi dan paling diminati untuk diperdagangkan dari 10 jenis yang ada di Indonesia. Kayunya banyak dimanfaatkan terutama untuk furniture. Eksploitasi kayu ramin yang berlebihan tanpa memperhitungkan kelestariannya menyebabkan jenis ini semakin sulit ditemukan sehingga jenis ini terancam kepunahan. Menurut CITES (*Convention on International Trade in Endangerred Species of Wild Fauna dan Flora*) jenis ramin dimasukkan ke dalam appendix III pada tahun 2001 (Soehartono dan Mardiasuti, 2003) dan meningkat menjadi appendix II pada tahun 2004.

Ramin diperbanyak secara generatif dengan menggunakan biji tetapi buahnya sulit ditemukan karena buah yang jatuh ke lantai hutan banyak dimakan hewan liar. Selain itu musim berbunga dan berbuah yang terjadi hanya sekali dalam 2 sampai 4 tahun. Mukjizat dan Hermansyah (2005) menyatakan bahwa interval berbunga dan

berbuah ini menyebabkan berbagai kesulitan dalam melakukan perbanyakan tanaman melalui biji. Selanjutnya Istomo (2005) menyatakan bahwa buah ramin bersifat rekalsitran sehingga tidak dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama. Upaya penyediaan bahan tanaman ramin juga dapat dilakukan dengan cara vegetatif seperti setek tetapi pertumbuhannya lambat. Yelnititis dan Komar (2008) menyatakan bahwa ramin dapat diperbanyak melalui kultur jaringan, tetapi tunas yang diperoleh mempunyai pertumbuhannya sangat lambat. Dari hal itu perlu dicari teknik lain sebagai upaya perbanyakan tanaman dengan rentang waktu yang relatif lebih singkat.

Perbanyakan tanaman melalui embriogenesis somatik merupakan pembentukan, pertumbuhan dan perkembangan embrio dari sel-sel soma atau dari sel-sel tubuh (Ammirato, 1983). Embriogenesis merupakan salah satu teknik yang menguntungkan untuk propagasi vegetatif massal dari spesies yang mempunyai nilai ekonomi tinggi (Blanc *et al.* 1999). Selanjutnya Molina *et al.* (2002) menyatakan bahwa embriogenesis somatik dapat terjadi baik secara langsung maupun secara tidak langsung. Embriogenesis somatik yang terjadi secara tidak langsung diawali dengan pembentukan kalus dan embrioid dapat dihasilkan melalui kultur kalus maupun suspensi sel (Noerhadi, 1974). Kalus embriogenik dapat dihasilkan

dari perlakuan 2,4-D dan atau dikombinasikan dengan zat pengatur tumbuh lain. Perbanyakan tanaman melalui embriogenesis somatik sudah banyak dilakukan baik pada tanaman berdinging lunak maupun pada tanaman berkayu. Menurut Ortiz *et al.* (2000) kalus embriogenik yang berasal dari embrio zigotik muda *Acacia farneciana* dan *A. schaffneri* dapat berkembang membentuk embrio somatik. Selanjutnya Yelnitis (2007 dan 2008) menyatakan bahwa embrio somatik dapat diinduksi dari eksplan potongan embrio muda tanaman *Shorea pinanga*. Embrio somatik yang dihasilkan memiliki sifat klonal yang sama seperti induknya dan juga mempunyai sifat juvenil seperti embrio yang berasal dari biji. Perbanyakan tanaman melalui embriogenesis somatik terdiri dari beberapa tahap yaitu tahap inisiasi kalus embriogenik, perbanyakan kalus embriogenik, pendewasaan, penuaan dan perkecambahan embrio somatik (von Arnold, 2002).

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan

metoda terbaik untuk induksi kalus friable dan embriogenik yang dapat berkembang membentuk embrio somatik.

II. BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Kultur Jaringan Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan, Yogyakarta.

Bagian yang digunakan sebagai eksplan adalah potongan daun tanaman *Gonystylus bancanus* (Miq.) Kurz yang masih muda dari anakan yang berasal dari Jambi. Media yang digunakan adalah modifikasi media dasar Murashige dan Skoog (MS) yang diperkaya dengan sukrosa dan agar. Penelitian dilakukan dalam 3 tahap yaitu :

1). Tahap induksi dan perbanyakan kalus.

Untuk menginduksi kalus digunakan 2,4-D dengan dosis antara 3,0 – 5,0 mg/l (Tabel 1).

Tabel 1. Perlakuan yang digunakan pada tahap induksi dan perbanyakan kalus.

Tahap induksi kalus	Tahap perbanyakan kalus
1. 3,0 mg/l 2,4-D	1. 5,0 mg/l 2,4-D + 1,0 mg/l thidiazuron
2. 3,5 mg/l 2,4-D	2. 5,0 mg/l 2,4-D + 1,5 mg/l thidiazuron
3. 4,0 mg/l 2,4-D	3. 5,0 mg/l 2,4-D + 2,0 mg/l thidiazuron
4. 4,5 mg/l 2,4-D	
5. 5,0 mg/l 2,4-D	

Kalus terbaik yang dihasilkan dari tahap induksi selanjutnya diperbanyak dalam media MS yang mengandung 5,0 mg/l 2,4-D

yang ditambah dengan thidiazuron antara 1,0 sampai 2,0 mg/l. Penelitian disusun dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap

dengan 10 kali ulangan. Peubah yang diamati pada tahap induksi dan perbanyakkan kalus adalah tekstur dan penampilan visual kalus yang dihasilkan.

2. Tahap induksi kalus remah.

Kalus dengan penampilan visual terbaik yang diperoleh pada tahap perbanyakkan kalus ditumbuhkan pada kombinasi perlakuan :

1. 6,0 mg/l 2,4-D + 1,0 mg/l thidiazuron
2. 6,0 mg/l 2,4-D + 1,5 mg/l thidiazuron
3. 6,0 mg/l 2,4-D + 2,0 mg/l thidiazuron
4. 6,0 mg/l 2,4-D + 1,0 mg/l thidiazuron + 1,0 mg/l biotin
5. 6,0 mg/l 2,4-D + 1,5 mg/l thidiazuron + 1,5 mg/l biotin
6. 6,0 mg/l 2,4-D + 2,0 mg/l thidiazuron + 2,0 mg/l biotin

Penelitian disusun dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dalam faktorial yang terdiri dari tiga faktor (zat pengatur tumbuh) dengan 10 kali ulangan. Peubah yang diamati adalah persentase kalus

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Induksi dan perbanyakkan kalus.

a. Induksi kalus.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kalus dapat diinduksi dari eksplan potongan daun (Gambar 1a) yang ditumbuhkan pada perlakuan 2,4-D dengan konsentrasi yang relatif lebih tinggi. Menurut Hagio (2002) serta Sujatha dan Prabakaran (2001) zat pengatur tumbuh dari kelompok auksin

dan penampilan visual kalus friabel yang dihasilkan.

3. Tahap induksi kalus embriogenik.

Kalus remah terbaik yang diperoleh dari tahap sebelumnya disubkultur pada perlakuan :

1. 7,0 mg/l 2,4-D + 1,0 mg/l biotin
2. 7,0 mg/l 2,4-D + 1,5 mg/l biotin
3. 7,0 mg/l 2,4-D + 2,0 mg/l biotin
4. 7,5 mg/l 2,4-D + 1,0 mg/l biotin
5. 7,5 mg/l 2,4-D + 1,5 mg/l biotin
6. 7,5 mg/l 2,4-D + 2,0 mg/l biotin
7. 8,0 mg/l 2,4-D + 1,0 mg/l biotin
8. 8,0 mg/l 2,4-D + 1,5 mg/l biotin
9. 8,0 mg/l 2,4-D + 2,0 mg/l biotin

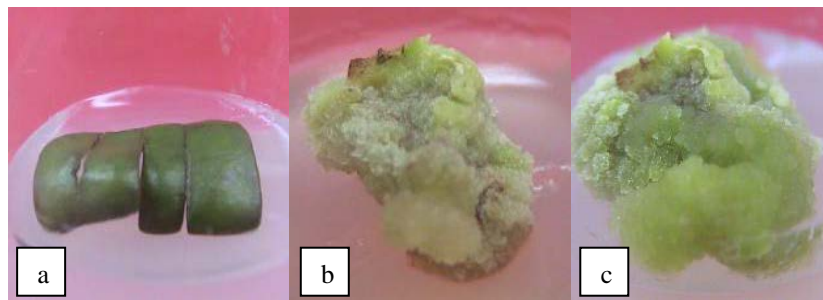
Peubah yang diamati adalah persentase kalus dan penampilan visual kalus yang dihasilkan. Penelitian disusun dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dalam faktorial dengan 10 kali ulangan. Data morfologi yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dan data kuantitatif dihitung rata-rata dengan standar deviasinya.

seperti 2,4-D penting untuk induksi kalus. Selain itu auksin juga dapat menyebabkan sel yang telah terdiferensiasi mampu mengalami dediferensiasi.

Induksi kalus diawali dengan penebalan eksplan pada bagian potongan dan di daerah yang mengalami pelukaan. Penebalan tersebut merupakan interaksi antara eksplan dengan media tumbuh, zat pengatur tumbuh dan lingkungan tumbuh sehingga eksplan bertambah besar. Menurut

Meagher dan Green (2002) ukuran eksplan bertambah menjadi empat kali lebih besar setelah dikulturkan selama 2 minggu pada tanaman *saw palmetto*. Pada penelitian ini induksi kalus dipengaruhi oleh konsentrasi 2,4-D yang digunakan. Semakin tinggi konsentrasi 2,4-D yang digunakan induksi kalus semakin cepat terjadi. Walaupun demikian tidak semua eksplan yang

dikulturkan dapat membentuk kalus. Pada perlakuan 2,4-D dengan konsentrasi yang lebih rendah, eksplan hanya memperlihatkan penebalan dan tidak berkembang menjadi kalus walaupun dikulturkan dalam jangka waktu yang lama. Menurut Gunawan (1987) konsentrasi zat pengatur tumbuh yang berbeda memberikan respon yang berbeda terhadap induksi kalus.



Gambar 1. a. Eksplan potongan daun; b - c . Kalus kompak dari perlakuan 2,4-D pada umur berbeda.

Dari beberapa konsentrasi 2,4-D yang digunakan, perlakuan 4.0 mg/l dan 5.0 mg/l merupakan perlakuan yang berhasil membentuk kalus. Kalus paling banyak dihasilkan dari perlakuan 2,4-D 5.0 mg/l yaitu mencapai 95 % dari eksplan yang dikulturkan. Hal ini menunjukkan bahwa untuk induksi kalus dibutuhkan 2,4-D dengan konsentrasi yang relatif tinggi. Hasil yang berbeda dari penelitian Yelnitis (2007) yang menunjukkan bahwa kalus dari potongan embrio muda tanaman *Shorea pinanga* dapat dihasilkan dari perlakuan 2,4-D dengan konsentrasi 3.5 mg/l. Sopiana (2004) dalam Bastoni (2005) menyatakan bahwa kalus dari eksplan potongan daun dapat diinduksi pada perlakuan NAA

maupun kombinasi NAA dengan kinetin. Selanjutnya Schestibratov *et al.* (2003) menyatakan bahwa kalus dari eksplan potongan kotiledon *Pinus radiata* dapat dihasilkan pada perlakuan dengan BAP dikombinasikan dengan IBA. Selain memberikan persentase kalus yang lebih tinggi, kalus dari perlakuan 2,4-D 5.0 mg/l memperlihatkan pertumbuhan yang lebih cepat. Rata-rata induksi kalus dari perlakuan ini terjadi 21 hari setelah dikulturkan. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan yang berbeda memberikan respon dan kecepatan tumbuh yang berbeda terhadap eksplan yang dikulturkan. Menurut Gunawan (1987) eksplan berbeda memberikan respon berbeda terhadap perlakuan yang sama. Hasil

penelitian Yelnitis (2008) menunjukkan bahwa induksi kalus dari eksplan potongan embrio muda *Shorea pinanga* pada perlakuan yang sama terjadi rata-rata 10 hari setelah dikulturkan, sedangkan induksi kalus dari potongan kotiledon *Pinus radiata* terjadi 4 - 5 minggu setelah dikulturkan (Schestibratov *et al.* 2003).

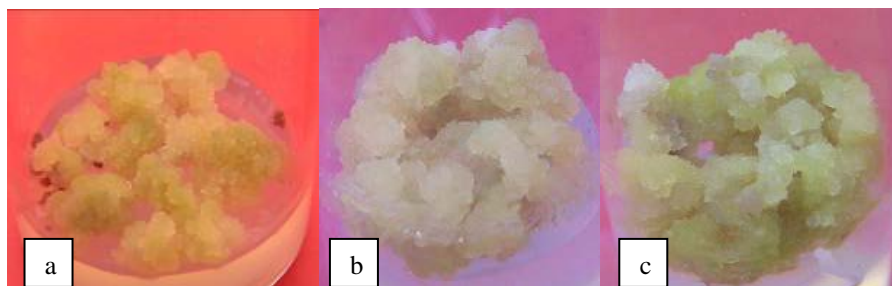
Kalus yang terbentuk pada tahap ini mempunyai tekstur kompak dan pada bagian permukaan berwarna putih (Gambar 1b). Kalus tipe ini umumnya mempunyai pertumbuhan yang lambat. Secara perlahan kalus mengalami pertumbuhan dan membesar, selanjutnya mengalami perubahan warna menjadi putih kehijauan dan segar (Gambar 1c). Dan sampai umur 18 minggu kalus yang diperoleh dari perlakuan ini tidak mengalami perubahan baik pada tekstur maupun warnanya.

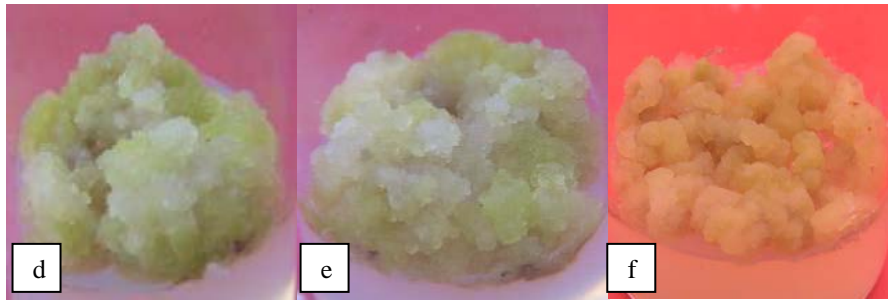
b. Perbanyak kalus

Kalus yang dihasilkan pada tahap induksi kalus masih terbatas karena tidak semua bagian eksplan memberikan respon dan membentuk kalus. Oleh karena itu kalus yang diperoleh diperbanyak dengan melakukan subkultur kalus secara berulang

pada perlakuan yang sama yaitu 2,4-D 5.0 mg/l dan dikombinasikan dengan thidiazuron (1.0, 1.5 dan 2.0 mg/l). Selain bertujuan untuk untuk perbanyak kalus, tahapan ini juga bertujuan untuk mendapatkan kalus remah dan noduler yang diharapkan berkembang menjadi kalus embriogenik. Kalus remah dapat dihasilkan melalui subkultur berulang pada perlakuan yang sama atau dikombinasikan dengan zat pengatur tumbuh yang lain maupun pada perlakuan yang berbeda.

Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa penggunaan 2,4-D melalui subkultur berulang dapat menghasilkan kalus dengan tekstur yang berbeda dengan kalus hasil inisiasi. Kalus yang dihasilkan agak kompak, berwarna hijau (Gambar 2a) dan memperlihatkan pertumbuhan yang agak lambat. Hal ini dapat diamati dan dibandingkan dengan kalus yang diperoleh dari perlakuan 2,4-D yang dikombinasikan dengan thidiazuron dengan waktu subkultur yang sama.





Gambar 2. a Kalus dari perlakuan 2,4-D dan b – f. Kalus dari perlakuan 2,4-D + thidiazuron

Penggunaan thidiazuron pada media yang sudah mengandung 2,4-D dapat merangsang kalus kompak berubah menjadi kalus semi remah. Selain itu pertumbuhan kalus juga lebih cepat dibandingkan dengan pertumbuhan kalus pada tahap induksi. Hal ini diduga disebabkan karena adanya pengaruh thidiazuron pada media yang sudah mengandung 2,4-D yang bekerja secara sinergis dan menyebabkan kandungan zat pengatur tumbuh di dalam jaringan kalus meningkat. Peningkatan tersebut menyebabkan jaringan mengalami stres sehingga terjadi pembelahan sel secara terus menerus di dalam jaringan dan akhirnya menyebabkan ukuran kalus bertambah besar. Guo *et al.* (2011) menyatakan bahwa

thidiazuron dapat memodifikasi hormon endogen baik secara langsung maupun tidak langsung dan menghasilkan reaksi pada sel dan jaringan yang dibutuhkan untuk pembelahan maupun regenerasi.

Tabel 2 memperlihatkan bahwa penggunaan 2,4-D yang dikombinasikan dengan thidiazuron menghasilkan kalus dengan tekstur yang berbeda dari perlakuan 2,4-D secara tunggal, baik pada tahap induksi maupun pada tahap perbanyakan kalus. Dari semua perlakuan 2,4-D + thidiazuron yang diuji dihasilkan kalus semi remah dengan jumlah mencapai 100 % setelah disubkultur sebanyak 4 kali dengan interval waktu selama 5 minggu.

Tabel 2. Kalus dari perlakuan 2,4-D + thidiazuron umur 8 minggu.

Perlakuan (mg/l)	%-ase kalus	Penampilan visual kalus
2,4-D 5.0 (kontrol)	100	Kompak, hijau, tumbuh agak lambat
2,4-D 5.0 + thi 1.0	100	Semi friabel, putih kekuningan, tumbuh cepat
2,4-D 5.0 + thi 1.5	100	Semi friabel, putih, tumbuh cepat
2,4-D 5.0 + thi 2.0	100	Semi friabel, putih kekuningan, tumbuh cepat

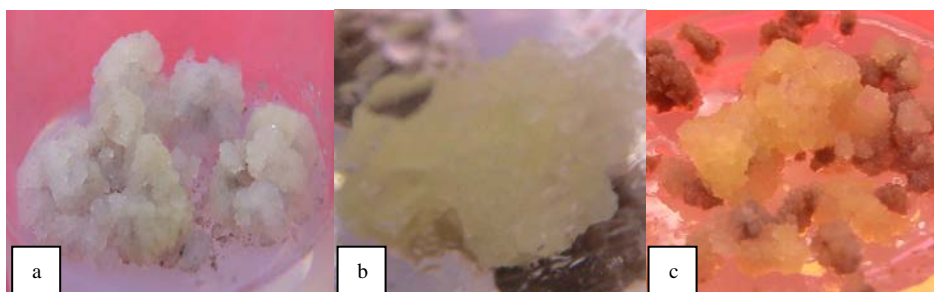
Ket. thi = thidiazuron

Kalus dari semua perlakuan tersebut mempunyai tekstur semi remah dan berwarna putih (Gambar 2b) atau putih kehijauan (Gambar 2c – d) atau kuning kehijauan (Gambar 2e – f). Hal ini menunjukkan bahwa untuk mendapatkan kalus yang lebih remah dibutuhkan senyawa atau zat pengatur tumbuh lain yang dikombinasikan dengan auksin. Hasil yang berbeda dari penelitian Guohua (1998) menunjukkan bahwa kombinasi auksin dengan thidiazuron menyebabkan terjadinya organogenesis pada tanaman *cassava*. Selanjutnya Aasim *et al.* (2009) menyatakan bahwa kalus dihasilkan dari perlakuan thidiazuron yang dikombinasikan dengan ekstrak ragi / yeast extract. Sementara Giridhar dan Ravishankar (2004) menyatakan bahwa dari perlakuan thidiazuron yang dikombinasikan dengan air kelapa menghasilkan tunas pada tanaman *Vanilla planifolia*. Pada penelitian ini semakin tinggi konsentrasi thidiazuron yang

digunakan semakin remah kalus yang dihasilkan. Hasil yang berbeda dari penelitian Yelnitis (2007) menunjukkan bahwa kalus remah dan embriogenik pada tanaman *Shorea pinanga* dihasilkan dari perlakuan yang hanya menggunakan 2,4-D.

2. Induksi kalus remah

Kalus semi remah yang mempunyai penampilan visual terbaik yang dihasilkan dari tahap perbanyakan kalus digunakan sebagai eksplan. Umumnya kalus remah dapat dihasilkan secara langsung dari berbagai jenis tanaman dan tipe eksplan, tetapi pada tanaman tertentu kalus tersebut dihasilkan melalui subkultur berulang pada perlakuan yang sama atau pada perlakuan berbeda. Upaya untuk mendapatkan kalus remah dilakukan dengan meningkatkan konsentrasi 2,4-D menjadi 6.0 mg/l dan dikombinasikan dengan thidiazuron (1.0, 1.5 dan 2.0 mg/l) dan atau biotin (1.0, 1.5 dan 2.0 mg/l).



Gambar 3. Kalus remah umur 35 hari dari perlakuan a. 2,4-D dan b – c. 2,4-D + biotin

Hasil penelitian menunjukkan bahwa peningkatan 2,4-D menjadi 6.0 mg/l dan dikombinasikan dengan thidiazuron memberikan respon yang baik terhadap kalus

yang dikulturkan. Kalus yang dihasilkan dari semua perlakuan 2,4-D + thidiazuron pada tahap ini mempunyai penampilan visual yang lebih baik dibandingkan dengan kalus yang

diperoleh pada tahap induksi dan kombinasi dengan sitokinin seperti perbanyakkan kalus. Kalus yang diperoleh dari semua perlakuan mempunyai tekstur remah dan berwarna putih (Gambar 3a). Hal ini menunjukkan bahwa untuk mendapatkan kalus remah dibutuhkan auksin dengan konsentrasi yang lebih tinggi dan atau thidiazuron. Auksin dapat menginduksi pembelahan sel maupun pertumbuhan sel. Dudits *et al.*, (1995) menyatakan bahwa penambahan zat pengatur tumbuh secara eksogen merupakan faktor eksternal yang berperan dalam reaktifasi siklus sel.

Tabel 3. Kalus dari perlakuan 2,4-D + thidiazuron + biotin.

Perlakuan (mg/l)	%-ase kalus	Penampilan visual kalus
2,4-D 6.0 + thi 1.0	100 %	remah, putih kekuningan, tumbuh cepat
2,4-D 6.0 + thi 1.5	100 %	remah, putih, tumbuh cepat
2,4-D 6.0 + thi 2.0	100 %	remah, putih kekuningan, tumbuh cepat
2,4-D 6.0 + thi 1.0 + bi 1.0	40 %	Sangat remah, putih kekuningan, tumbuh cepat
2,4-D 6.0 + thi 1.5 + bi 1.5	50 %	Sangat remah, kuning muda, tumbuh cepat
2,4-D 6.0 + thi 2.0 + bi 2.0	50 %	Sangat remah, kuning muda, tumbuh cepat

Ket. 2,4-D = dichloro phenoxy acetic acid
thi = thidiazuron
bi = biotin

Tabel 3 memperlihatkan persentase kalus remah yang dihasilkan dari semua perlakuan yang diuji. Persentase kalus remah tertinggi dihasilkan dari semua perlakuan 2,4-D + thidiazuron yaitu 100 %, sedangkan penggunaan biotin pada media yang sudah mengandung 2,4-D dan thidiazuron memberikan persentase kalus remah yang lebih rendah yaitu antara 40 – 50 %. Hal ini disebabkan karena hanya sebagian dari kalus yang dikulturkan pada perlakuan 2,4-D + thidiazuron + biotin yang mengalami pertumbuhan dan pembelahan sedangkan kalus yang berada pada bagian bawah menjadi coklat dan mati (Gambar 3b – c).

Walaupun persentase kalus remah yang dihasilkan rendah, perlakuan kombinasi

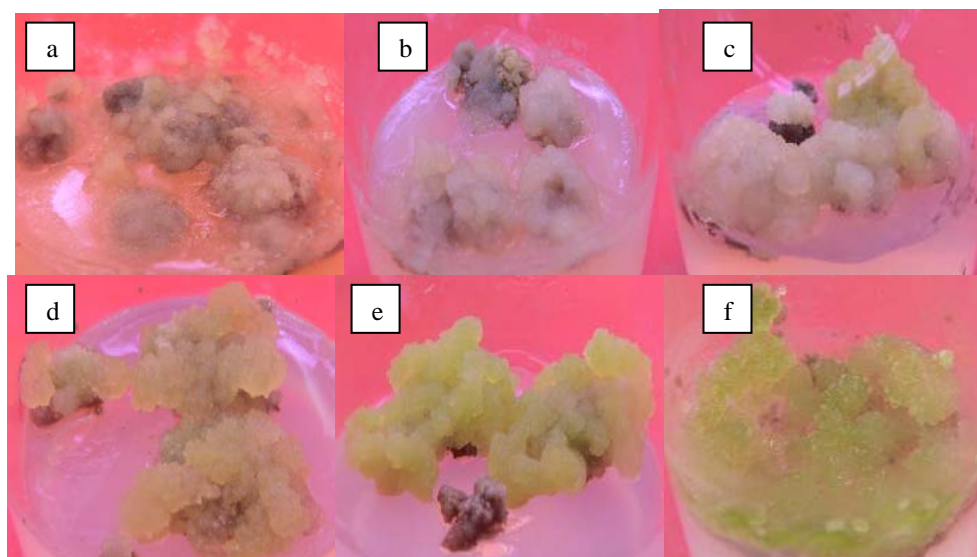
2,4-D 6.0 mg/l dan thidiazuron 1.5 mg/l dan biotin 1.5 mg/l menghasilkan kalus remah dengan visual yang lebih baik dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Kalus yang dihasilkan dari perlakuan ini sangat remah dan mudah dipisahkan dan kandungan airnya sedikit (Gambar 3c). Hal ini menunjukkan bahwa untuk mendapatkan kalus yang remah dibutuhkan auksin, sitokinin dan senyawa lain seperti biotin dan semakin tinggi konsentrasi biotin yang digunakan semakin remah kalus yang dihasilkan. Selain itu kalus yang dihasilkan berwarna putih kekuningan (Gambar 3b) dan dalam pertumbuhannya kalus tersebut memperlihatkan perubahan warna menjadi kuning muda (Gambar 3c).

3. Induksi kalus embriogenik

Kalus remah dari perlakuan dan penampilan visual terbaik yang diperoleh dari tahap sebelumnya dijadikan sebagai eksplan. Dalam pertumbuhannya tidak semua eksplan kalus remah yang dikulturkan pada semua perlakuan 2,4-D yang dikombinasikan dengan biotin mampu tumbuh dan membelah. Sebagian besar eksplan kalus remah memperlihatkan perubahan warna. Perubahannya terutama terjadi pada kalus yang berada pada bagian bawah. Eksplan kalus remah yang berwarna kuning muda berubah menjadi kecoklatan dan akhirnya mati. Hal ini diduga disebabkan karena kalus remah yang digunakan sebagai eksplan masih sangat muda dan basah sehingga mudah luka dan mengalami kendala untuk beradaptasi pada perlakuan yang baru. Sedangkan kalus yang berada di bagian permukaan dan utuh tetap mengalami pertumbuhan dan pembelahan (Gambar 4a - c). Kalus yang dihasilkan dari semua

perlakuan yang diuji berwarna putih sampai putih kekuningan. Hal ini merupakan salah satu sebagai ciri kalus yang dapat berkembang menjadi embriogenik.

Peningkatan penggunaan 2,4-D dari 6.0 mg/l menjadi 8.0 mg/l memberikan pengaruh yang baik terhadap tekstur kalus yang dihasilkan. Pada penelitian ini semakin tinggi konsentrasi 2,4-D dan kombinasi dengan biotin yang digunakan pada tahap ini semakin remah kalus yang dihasilkan. Perlakuan 2,4-D 7.0 mg/l yang dikombinasikan dengan biotin 1.5 mg/l merupakan perlakuan terbaik terhadap tekstur kalus yang dihasilkan. Kalus yang dihasilkan dari perlakuan ini sangat remah dan sangat mudah dipisahkan. Dalam pertumbuhannya kalus tersebut mengalami perubahan warna menjadi kekuningan atau kuning muda (Gambar 4d) berubah menjadi kuning kehijauan (Gambar 4e) dan selanjutnya menjadi hijau (Gambar 4f).



Gambar 4. a – f. Pertumbuhan kalus remah dari perlakuan 2,4-D + biotin.

Kalus remah dengan penampilan visual terbaik yang dihasilkan dari perlakuan ini belum termasuk kalus embriogenik. Upaya untuk mendapatkan kalus embriogenik dengan melakukan subkultur berulang pada perlakuan yang sama juga belum memberikan hasil. Semua kalus dari perlakuan ini hanya melakukan pembelahan dan tetap berwarna hijau. Kalus embriogenik mempunyai ciri-ciri tekstur remah, noduler dan berwarna putih atau kekuningan. Kalus embriogenik umumnya dapat diinduksi dengan menggunakan zat pengatur tumbuh auksin seperti 2,4-D (Litz *et al.* 1998); NAA dan 2,4,5 T (Nugent *et al.*, 2001), picloram (Stella dan Braga, 2002) dan dicamba (Sagare *et al.*, 1993) atau dikombinasikan dengan sitokinin. Selanjutnya kalus embriogenik dapat terbentuk secara langsung atau melalui subkultur berulang baik pada perlakuan yang sama maupun pada perlakuan yang berbeda. Menurut Indrianto (2002) insiasi kalus embriogenik terjadi sebagai respon dari stres akibat pengaruh konsentrasi auksin yang relatif tinggi. Selanjutnya Dunstan *et al.* (1995) mendapatkan kalus embriogenik pada tanaman berkayu dengan penggunaan 2,4-D. Hasil yang berbeda dengan penelitian Guohua (1998) menunjukkan bahwa penggunaan auksin yang dikombinasikan dengan thidiazuron menyebabkan terjadinya organogenesis pada tanaman *cassava*.

IV. KESIMPULAN

Perlakuan 5.0 mg/l 2,4-D merupakan salah satu perlakuan yang dapat membentuk kalus dengan tekstur kompak dan berwarna hijau. Perlakuan 6.0 mg/l 2,4-D + 1.5 mg/l thidiazuron + 1.5 mg/l biotin merupakan perlakuan terbaik untuk induksi kalus remah. Persentase kalus remah yang dihasilkan mencapai 100 %. Perlakuan 7.0 mg/l 2,4-D + 1.5 mg/l biotin merupakan perlakuan terbaik untuk pembentukan kalus yang sangat friabel dan berwarna putih kekuningan. Jumlah kalus yang sangat friabel dihasilkan dari perlakuan ini adalah sebanyak 50 %. Dari penelitian ini belum dihasilkan kalus embriogenik sehingga perlu dilakukan penelitian lanjutan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih yang setulus-tulusnya kepada ITTO telah memberikan dukungan dana dalam pelaksanaan penelitian ini melalui proyek "Further analyses of genetic relationship between species and *in vitro* propagation of *Gonystylus spp*".

DAFTAR PUSTAKA

- Aasim, M., K.M. Khawar and S. Ozcan. 2009. Comparison of shoot regeneration on different concentration of thidiazuron from shoot tip explant of Cowpea on gelrite and agar containing medium. Not. Bot. Hort. Agrobot Cluj 37 (1) : 89 – 93.
- Bastoni. 2005. Kajian ekologi dan silvikultur ramin di Sumatera Selatan dan Jambi. Prosiding Semiloka Nasional Konservasi

- dan pembangunan hutan ramin di Indonesia.. Bogor, 28 September 2008.
- Blanc, GN; Michaux-Ferriere; C. Teisson; L. Larder and M.P. Carron. 1999. Effects of carbohydrate addition on the induction of embryogenesis in *Havea brasiliensis*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 59 : 103 – 112.
- Dudits, D.J.G., L. Bogre and L. Bako. 1995. Molecular biology of somatic embryogenesis. In. Thorpe, T.A. (eds.) *In vitro* embryogenesis in plant. Kluwer Acad. Publ. p. 267 – 269.
- Dunstan, D.I., T.E. Tautorius & T.A. Thorpe. 1995. Somatic embryogenesis in woody plants In Thorpe, T.A. (ed) *In vitro* embryogenesis in plants (pp 471 – 538). Kluwer Acad.Publ. Dordrecht. The Netherlands.
- Giridhar, P. and G.A. Ravishankar. 2004. Efficient micropropagation of *Vanilla planifolia* Andr. Under influence of thidiazuron, zeatin and coconut milk. Indian Journal of Biotechnology 3 : 113 – 118.
- Gunawan. LW. 1987. Teknik kultur jaringan. PAU IPB, Bogor. 187 hal.
- Guohua, M. 1998. Effects of cytokinins and auxins on cassava shoot organogenesis and somatic embryogenesis from somatic embryos explants. Plant Cell Tissue and Organ Culture 54 : 1 – 7.
- Guo, B; BH Abbasi; A. Zeb; LL Xu and YH Wei. 2011. Thidiazuron : a multi-dimensional plant growth regulator. Afr. J. Biotechnology 10 (45) : 8984 – 9000.
- Hagio, T. 2002. Adventitious shoot regeneration from immature embryos of *sorghum*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 68 : 65 – 72.
- Indrianto, A. 2002. Kultur jaringan tumbuhan. Fak. Biologi UGM. Yogyakarta. 134 hal.
- Istomo. 2005. Evaluasi penanaman ramin (*Gonystylus* spp.) di Indonesia : kendala dan program kegiatan dalam pembangunan hutan tanaman ramin. Prosiding Semiloka Nasional, Konservasi dan pembangunan hutan ramin di Indonesia melalui regulasi perdagangan dan pemacuan alih teknologi, konservasi, penanaman dan teknik silvikultur. Bogor. Hal 79 – 108.
- Litz, R.E and D.J. Gray. (1995). Somatic embryogenesis for agriculture improvement. World Jour. Microbiol. And Biotech 11 : 416 – 425.
- Meagher, M.G and J. Green. 2002. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of saw palmetto, an important landscape and medicinal plant. Plant Cell Tissue and Organ Culture 66 : 253 – 256.
- Molina, D.M., M.E. Aponte, H. Cortina and German Moreno. 2002. The effect of genotype and explant age on somatic embryogenesis of Coffe. Plant Cell Tissue and Organ Culture 71 : 117 – 125.
- Mukjizat dan Hermansyah. 2005. Praktek pengelolaan dan pelestarian ramin (*Gonystylus bancanus*, (Miq) Kurz.) di PT. Diamond Raya Timber. Prosiding Semiloka Nasional Konservasi dan Pembangunan Hutan Ramin di Indonesia. Bogor, 28 September.
- Noerhadi, E. 1974. Kultur jaringan tumbuhan sebagai bahan penyelidikan dan potensinya dalam pembangunan negara. Pidato pengukuhan guru besar tetap ITB. Penerbit ITB. Bandung.
- Nugent, G.; S.F. Chandler, P.Whitemean and T.W. Stevenson. 2001. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus globules*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 67 : 85 – 88.
- Ortiz, B.O.C., M.E.P. Reyes & P.E.M. Balch. 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Acacia farnesiana* and *A. schaffneri*. In vitro Cell Dev. Biol. Plant 36 : 268 – 272.
- Sagare, A.P., K. Suhasini and K.V. Krishnamurthy. 1993. Plant regeneration via somatic embryogenesis in chick pea (*Cicer arietinum* L.). Plant Cell Reports 12 : 652 – 655.
- Schestibratov, K.A; R.V. Mikhailov and S.V. Dolgov. 2003. Plantlet regeneration from subculturable nodular callus of *Pinus radiata*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 72 : 139 - 146.
- Soehartono, T dan A. Mardiasuti. 2003. Pelaksanaan konvensi CITES di Indonesia. JICA. 20 hal.
- Stella, A. and M.R. Braga. 2002. Callus and suspension cultures of *Rudgea jasminoides*, a tropical woody Rubiaceae. Plant Cell Tissue and Organ Culture 68 : 271 -278.
- Sujatha, M. and A.J. Prabakaran. 2001. High frequency embryogenesis in immature

- zygotic embryos of *sunflower*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 65 : 23 – 29.
- von Arnold, S., I. Sabala, P. Bozhkov, J. Dyachok and L. Filonova. 2002. Development pathways of somatic embryogenesis. Plant Cell Tissue and Organ Culture 69 : 233 – 249.
- Yelnititis. 2007. Induksi embrio somatik *Shorea pinanga* Sheff. dengan 2,4-D dan NAA. Jurnal Penelitian Tanaman Hutan 4 (1) : 235 – 243.
- Yelnititis. 2008. Regenerasi tanaman *Shorea pinanga* Scheff. melalui embryogenesis somatic. Jurnal Penelitian Hutan Tanaman 5 (1) : 33 – 44.
- Yelnititis dan T.E. Komar. 2008. Perbanyakan vegetatif ramin (*Gonystylus bancanus* (Miq.) Kurz) secara in vitro. Laporan Hasil penelitian. 24 hal.

